

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. August 2005 (25.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/077414 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 39/395**,  
9/08, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/000797

(22) Internationales Anmeldedatum:  
27. Januar 2005 (27.01.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
60/543,549 12. Februar 2004 (12.02.2004) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter  
Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MATHEUS, Su-  
sanne** [DE/DE]; Realschulstrasse 19, 54347 Neuma-  
gen-Dhron (DE). **MAHLER, Hanns-Christian** [DE/DE];  
Buschungstrasse 54a, 65205 Wiesbaden (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH**;  
Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: HIGHLY CONCENTRATED LIQUID FORMULATIONS OF ANTI-EGFR ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: HOCHKONZENTRIERTE, FLÜSSIGE FORMULIERUNGEN VON ANTI-EGFR-ANTIKÖRPERN

(57) Abstract: The invention relates to methods for producing, by ultrafiltration, highly concentrated liquid formulations containing at least one anti-EGFR antibody and/or one of its variants and/or fragments, particularly monoclonal antibodies against the EGF receptor, particularly preferred Mab C225 (cetuximab) and Mab h425 (EMD 72000). The invention also relates to highly concentrated liquid formulations of anti-EGFR antibodies, particularly monoclonal antibodies against the EGF receptor, particularly preferred Mab C225 (cetuximab) and Mab h425 (EMD 72000) and/or their variants and/or fragments. The invention is characterized in that the highly concentrated liquid formulations have a content of anti-EGFR antibodies ranging from 10 to 250, preferably from 50 to 180 mg/ml, particularly preferred from 100 to 150 mg/ml. Finally, the invention relates to the use of these formulations.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente, insbesondere monoklonale Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000), durch Ultrafiltration. Die Erfindung betrifft weiterhin hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern, insbesondere von monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor, besonders bevorzugt Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten und/oder Fragmente, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen einen Gehalt von anti-EGFR-Antikörpern von 10 - 250, bevorzugt 50 - 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 - 150 mg/ml aufweisen und deren Verwendung.

WO 2005/077414 A1

## Hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern

### Hintergrund der Erfindung

5

10

15

20

25

30

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente, insbesondere monoklonale Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor, besonders bevorzugt Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000), durch Ultrafiltration. Die Erfindung betrifft weiterhin hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern, insbesondere von monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten und/oder Fragmente, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierten, flüssigen Formulierungen einen Gehalt von anti-EGFR-Antikörpern von 10 – 250, bevorzugt 50 – 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 – 150 mg/ml aufweisen und deren Verwendung.

Fortschritte im Bereich der Biotechnologie machten es im Laufe der letzten 10 Jahre möglich eine Reihe von Proteinen zur pharmazeutischen Anwendung mittels rekombinanter DNA-Techniken herzustellen. Proteinarzneimittel wie monoklonale Antikörper finden ihre Anwendung beispielsweise in der Tumorthherapie, z.B. zur spezifischen Immuntherapie oder Tumorstabilisierung. Therapeutische Proteine sind größer und komplexer als herkömmliche organische und anorganische Wirkstoffe und sie weisen komplexe dreidimensionale Strukturen und zahlreiche funktionelle Gruppen auf, die die biologische Aktivität des Proteins bedingen oder auch unerwünschte Wirkungen hervorrufen können.

Proteinarzneimittel sind während Herstellung, Lagerung und Transport zahlreichen exogenen Einflüssen ausgesetzt, die sich stabilitätsmindernd auf den Proteinwirkstoff auswirken können. Es ist daher erforderlich, die Ursachen und Mechanismen der speziellen Abbaureaktionen genau zu studieren, um z.B. durch Zusatz bestimmter stabilisierender Hilfsstoffe das Protein stabilisieren zu können (siehe z.B. Manning M.C., Patel K., & Borchardt R.T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. Pharm. Res. 6, 903-918).

Aus der Literatur sind zahlreiche Formulierungen therapeutischer Proteine bekannt. Die Anforderungen an die Zusammensetzung einer pharmazeutischen Zubereitung von Proteinwirkstoffen können jedoch sehr unterschiedlich sein und im Allgemeinen ist es aufgrund spezifischer physikochemischer Eigenschaften und Abbaureaktionen der unterschiedlichen Proteine nicht möglich, bereits etablierte Proteinformulierungen auf neue Protein-Wirkstoffe zu übertragen. Deshalb sind geeignete pharmazeutische Formulierungen dieser neuartigen Wirkstoffe noch immer eine große Herausforderung.

In bisheriger Literatur wird zwar die Ultrafiltration als Standardmethode im Downstreamprocessing bei der Aufreinigung von rekombinaten Proteinen beschrieben (Taylor and Francis (2000) Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, London, p. 1-212; McPherson A. (1989) Separation Methods, Preparation and Analysis of Protein Crystals: New York, Robert E. Krieger Publishing Co., Inc., p. 1-51) allerdings werden beim Downstreamprocessing keine vorteilhaft hohen Konzentrationen erzielt. Zudem kann es durch nachfolgende Aufreinigungs- und Chromatographieschritte wieder zur Verdünnung der erhaltenen Prozesslösungen kommen.

Die US 6,252,055 beschreibt zwar die Herstellung von hochkonzentrierten Antikörperformulierungen mittels Ultrafiltration, allerdings weisen die so

hergestellten Antikörperformulierungen bereits direkt nach Herstellung einen hohen Anteil an löslichen Aggregaten von  $\geq 4\%$  auf. Zudem werden die erhaltenen Antikörperformulierungen nicht hinsichtlich ihrer nativen Struktur und Stabilität charakterisiert, was beispielsweise als sehr wichtig im Hinblick auf die Immunogenität und Wirksamkeit der Antikörperformulierung anzusehen ist.

Der nachteilige Einfluss von Aggregaten auf die verstärkte Immunogenität und verminderte Wirksamkeit sowie die reduzierte Bioverfügbarkeit von Proteinformulierungen ist bereits aus der Literatur bekannt (S. A. Marshall, G. A. Lazar, A. J. Chirino, and J. R. Desjarlais. Rational design and engineering of therapeutic proteins. Drug Discovery Today 8 (5):212-221, 2003; Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. Nat Rev Drug Discov 1 (6):457-462, 2002).

Aus obengenannten Gründen wird klar, dass sich die Herstellung von flüssigen hochkonzentrierten Formulierungen von Antikörpern, die über eine ausreichend lange Zeit stabil sind, für den Fachmann als äußerst schwierig gestaltet. Zudem war die Herstellung einer hochkonzentrierten flüssigen Formulierung für den Fachmann unattraktiv, da die stark ausgeprägte Aggregationstendenz von Proteinen und insbesondere von Antikörpern schon bei niedrigen Konzentrationsbereichen hinreichend bekannt war (S. A. Marshall, G. A. Lazar, A. J. Chirino, and J. R. Desjarlais. Rational design and engineering of therapeutic proteins. Drug Discovery Today 8 (5):212-221, 2003). So wird in der Literatur die Aggregation von Proteinen als die am häufigsten auftretende physikalische Instabilitätsreaktion beschrieben (W. Wang. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. Int.J.Pharm. 185 (2):129-188, 1999).

Formulierungen enthaltend Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) sind zwar aus der WO03053465 und aus der WO03007988 bekannt, jedoch weisen die aus der WO03053465 bekannten  
5      Formulierungen eine relativ geringe Proteinkonzentration auf und sie sind langfristig bei Raumtemperatur nicht stabil. Die aus der WO03007988 bekannten Formulierungen weisen ebenfalls eine relativ geringe Proteinkonzentration auf und die Zubereitung (Lyophilisat) muss vor Anwendung noch rekonstituiert werden.

10     Der Prozess der Lyophilisierung zur Stabilisierung von Proteinformulierungen ist beispielsweise aus der WO9300807 oder WO9822136 bekannt, jedoch bestehen signifikante Nachteile von lyophilisierten Zubereitungen darin, dass der Anwender das Lyophilisat vor Anwendung noch rekonstituieren muss, was eine erhebliche Fehlerquelle  
15     bei der Zubereitung vor der Anwendung darstellt. Da ein weiterer Herstellungsprozess im Vergleich zu flüssigen Formulierungen hinzukommt, ist der Prozess hinsichtlich zusätzlichem Aufwand für Prozessentwicklung (Gewährleistung der Stabilität bei der Lyophilisierung), Herstellung (Herstellungskosten und -dauer) und z.B. Validierung  
20     ungünstig.

Bei den bisher bekannten Formulierungen geringer Proteinkonzentration, werden bei intervenöser Verabreichung hohe Infusionsvolumina notwendig. Aufgabe der Erfindung war deshalb die Aufkonzentrierung  
25     erfindungsgemäßer Antikörper, so dass durch Reduktion der zu applizierenden Volumina auch eine subkutane Applikation in Betracht gezogen werden kann. Subkutan zu applizierende Formulierungen dürfen ein Volumen von 1,0 – 1,5 ml nicht überschreiten und müssen ferner euhydrisch (pH 7,2 bzw. pH 4,0 – 9,0) und isotonisch (ca. 290 mOsm)  
30     sein. Ein weiterer Vorteil subkutaner Formulierungen liegt in der Möglichkeit der Selbstverabreichung durch den Patienten. Allerdings sollte bei der Aufkonzentrierung die Stabilität des Proteins nicht beeinträchtigt

werden, d.h. der Anstieg an Zersetzungs- und Aggregationsprodukten sollte im Rahmen der Spezifikationen akzeptabel sein. Weiterhin sollten solche Formulierungen frei von toxikologisch bedenklichen Stoffen sein bzw. diese nur in physiologisch unbedenklichen Konzentrationen  
5 enthalten.

Da sich durch die zu erwartenden Schwierigkeiten bereits etablierte Proteinformulierungen im Allgemeinen nicht auf neue Protein-Wirkstoffe übertragen lassen, war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue  
10 stabile, hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen für für therapeutische Proteine, insbesondere monoklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor, beispielsweise Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000), zu finden, die eine erhöhte Stabilität gegenüber Stressbedingungen, wie erhöhter Temperatur, Luftfeuchtigkeit und/oder Scherkräften aufweisen, so  
15 dass bei Herstellung, Lagerung, Transport und Applikation deren Wirksamkeit erhalten bleibt und diese Formulierungen keine toxikologisch bedenklichen Hilfsstoffe enthalten.

### **Zusammenfassung der Erfindung**

Überraschenderweise lassen sich mit Hilfe von Ultrafiltrationsverfahren hochkonzentrierte pharmazeutische Zubereitungen von anti-EGFR-Antikörpern erhalten, die in einer flüssigen Formulierung  
20 Proteinkonzentrationen von 10 - 250 mg/ml, besonders bevorzugt von 50 - 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 - 150 mg/ml ermöglichen.  
25 Die durch den Ultrafiltrationsprozess erhaltenen Formulierungen sind vorzugweise über einen längeren Zeitraum stabil oder sie können bei Bedarf mit geeigneten stabilisierenden Hilfsstoffen versetzt oder durch nachfolgende Lyophilisierung stabilisiert werden.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen sind physiologisch gut verträglich, leicht herstellbar, exakt dosierbar und über die Dauer der Lagerung, bei mechanischer Belastung und z.B. bei mehrfachen Einfrier- und Auftauvorgängen stabil.

5

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die durch erfindungsgemäße Verfahren hergestellten hochkonzentrierten Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern einen Monomeranteil von > 99% enthalten. Die erhaltenen erfindungsgemäßen hochkonzentrierten, flüssigen

10

Formulierungen mit einer Konzentration von 10 - 250 mg/ml, besonders bevorzugt von 50 - 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 - 150 mg/ml sind physikalisch und chemisch stabil, d.h. es kommt zu keiner

Veränderung des Monomerengehaltes mit einhergehender Zunahme von löslichen Aggregaten, was als sehr kritisch im Hinblick auf Wirksamkeit

15

und auf immunogene Nebenwirkungen anzusehen wäre (Schellekens H. (2002) Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals.: Nat. Rev. Drug Discov., v. 1, p. 457-462). Auch kommt es durch die

angewandten Ultrafiltrationsverfahren zu keiner Änderung der Primärstruktur des Proteins. Außerdem zeigen sich hinsichtlich der

20

mechanischen Stabilität und der thermischen Stabilität keine Nachteile gegenüber den niedrig konzentrierten Proteinformulierungen.

Insbesondere liegen die charakterisierten Aggregationsprodukte auch für die erfindungsgemäßen hochkonzentrierten, flüssigen

Antikörperformulierungen im Bereich der festgesetzten Spezifikationen.

25

Dies war nicht zu erwarten, da bei hochkonzentrierten

Proteinformulierungen die Tendenz zur Instabilität weitaus größer ist als bei verdünnten Proteinformulierungen (Fields, G., Alonso, D., Stiger, D., Dill, K. (1992) "Theory for the aggregation of proteins and copolymers." J.

30

Phys. Chem. 96, 3974-3981). Bei einer hohen Proteinkonzentration ist die "Packungsdichte" der Proteinmoleküle erhöht. Eine vermehrte Anzahl an Kollisionen ist demnach anzunehmen und es kann zu gelegentlichen

Protein-Assoziationen kommen. Dieser Prozess erfolgt in der Regel durch Nukleations- und Wachstumsmechanismen, bei der die kritischen Nuklei oft lösliche assoziierte Proteine darstellen, die sich jedoch schnell in unlösliche Proteinpräzipitate (denaturiertes Protein) umwandeln können (Reithel, J.F. (1962) „The dissociation and association of protein structures“, Adv. Protein Chem. 18, 123). Die Größe der Proteinaggregate erhöht sich mit steigender Proteinkonzentration, wie für das  $\beta$ -Lactoglobulin bereits gezeigt werden konnte (Roefs, S.P.F.M., De Kruif, K.G. (1994) "A model for the denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin" Eur. J. Biochem. 226, 883-889).

Die nachfolgend beschriebenen erfindungsgemäßen Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zeichnen sich überraschenderweise durch einen oder mehrere Vorteile aus, ausgewählt unter: hohe Proteinkonzentration, hohe Stabilität, geringe Aggregationstendenz, geringe Viskosität, hohe Reinheit, Abwesenheit pharmazeutisch bedenklicher Agenzien und damit hohe Sicherheit, gute Verträglichkeit und Möglichkeit der direkten Verwendung.

Nachfolgend beschriebene erfindungsgemäße Herstellungsverfahren zeichnen sich überraschenderweise durch einen oder mehrere Vorteile aus, ausgewählt unter: Einfachheit, Zeit- und Kostenersparnis, Verwendung pharmazeutisch unbedenklicher Agenzien, hohe Ausbeute. Erfindungsgemäße Verfahren sind somit in der Durchführung vorzugsweise wesentlich einfacher, zeitsparender und kosteneffektiver als die in der Literatur beschriebenen Techniken, da überraschenderweise durch Ultrafiltration stabile, hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern erhalten werden, die obengenannte Vorteile aufweisen.

Gegenstand der Erfindung sind deshalb Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen enthaltend wenigstens einen



anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente durch Ultrafiltration. Erfindungsgemäße Verfahren sind insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltenen hochkonzentrierten, flüssigen Formulierungen einen Gehalt wenigstens eines anti-EGFR-Antikörpers von 10 – 250 mg/ml, bevorzugt 50 – 180 mg/ml, besonders bevorzugt 100 – 150 mg/ml aufweisen.

Weiterhin sind erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die anti-EGFR-Antikörper monoklonal sind und muriner oder humaner Herkunft, bevorzugt muriner Herkunft und chimär oder humanisiert. Besonders bevorzugt sind die anti-EGFR-Antikörper Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000) und/oder deren Varianten und/oder Fragmente.

Erfindungsgemäße Verfahren der Ultrafiltration Ultrafiltrationsverfahren wie gerührte Ultrafiltration und Tangentialflussfiltration (TFF).

Die Ultrafiltration der erfindungsgemäßen Antikörper erfolgt vorzugsweise in einem geeigneten Puffersystem, d.h. es ist keine Stabilisierung der Reaktionslösungen wie z.B. durch Detergenzien notwendig. Die Verwendung von Detergenzien in Zubereitungen zur parenteralen Anwendung ist generell zu vermeiden bzw. zu minimieren, da von ihnen ein nicht unerhebliches toxisches und immunogenes Potential ausgeht (Sweetana S. & Akers M.J. (1996) Solubility principles and practices for parenteral drug dosage form development. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 50, 330-342) und sie auch zur Veränderung der Sekundärstruktur von Proteinen führen können (Vermeer A.W.P. & Norde W. (2000) The influence of the binding of low molecular weight surfactants on the thermal stability and secondary structure of IgG. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 161, 139-150). Außerdem gestaltet sich die Prozessführung einer Ultrafiltration von Detergenzhaltigen Formulierungen als schwierig, da es aufgrund möglicher

Mizellbildung des Detergens zu einer unvorteilhaften und unkontrollierbaren Anreicherung des Detergens im Produkt kommen kann.

5 Bezüglich der erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörper und im Rahmen der vorliegenden Erfindung, versteht man unter „biologisch aktiv“, „nativ“ und „wirksam“, dass erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper auch nach Überführung in erfindungsgemäße Formulierungen ihre biologische Wirkung ausüben können, insbesondere die Bindung an EGFR, Inhibition der Bindung von Liganden, insbesondere EGF, an den EGFR, Modulation, 10 insbesondere Inhibition der EGFR-vermittelten Signaltransduktion und Prophylaxe oder Therapie von EGFR-vermittelten Erkrankungen.

anti-EGFR-Antikörper: Erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper sind vorzugsweise monoklonal und muriner oder humaner Herkunft, besonders 15 bevorzugt sind sie muriner Herkunft und chimär oder humanisiert. Bei dem gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) gerichteten Antikörper handelt es sich besonders bevorzugt um Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten oder Fragmente. Weitere gegen den EGFR gerichtete Antikörper sind z.B. in 20 der EP0586002 sowie in J. Natl. Cancer Inst. 1993, 85: 27-33 (Mab 528) beschrieben.

Mab C225 (Cetuximab, Erbitux<sup>TM</sup>): Mab C225 (Cetuximab) ist ein klinisch erprobter Antikörper, der an den EGF-Rezeptor bindet. Mab C225 25 (Cetuximab) ist ein chimärer Antikörper, dessen variable Regionen murinen und dessen konstante Regionen humanen Ursprungs sind. Er wurde erstmals von Naramura et al., Cancer Immunol. Immunotherapy 1993, 37: 343-349 sowie in WO 96/40210 A1 beschrieben.

30 Mab h425 (EMD 72000): Mab h425 (EMD 72000) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper (Mab), der aus dem murinen anti-EGFR-Antikörper 425 (Mab 425) erhalten wurde (EP0531472). Der murine

monoklonale Antikörper Mab 425 wurde in der humanen Karzinomzelllinie A431 entwickelt, da er hier an ein extrazelluläres Epitop des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) bindet. Es wurde gefunden, dass er die Bindung von EGF inhibiert (Murthy et al., 1987). Erhöhte Expression von EGFR wird in malignen Geweben aus unterschiedlichen Quellen gefunden, so dass Mab 425 ein möglicher Wirkstoff zur Diagnose und therapeutischen Behandlung von humanen Tumoren ist. So wurde gefunden, dass Mab 425 in vitro Tumorzytotoxizität vermittelt und in vitro das Tumorwachstum von Zelllinien epidermoider und colorektaler Karzinome unterdrückt (Rodeck et al., 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mab 425 an Xenografts von humanen malignen Gliomen in Mäusen bindet (Takahashi et al., 1987). Seine humanisierten und chimären Formen sind z.B. aus EP0531472; Kettleborough et al., Protein Engineering 1991, 4: 773-783; Bier et al., Cancer Chemother Pharmacol. 2001, 47: 519-524; Bier et al., Cancer Immunol. Immunother. 1998, 46: 167-173 bekannt. Mab h425 (EMD 72000) ist dabei ein in der klinischen Phase I/II befindlicher humanisierter Antikörper (h425), dessen konstanter Bereich sich aus einer  $\kappa$  und einer humanen  $\gamma$ -1-Kette zusammensetzt (EP0531472).

Humane anti-EGFR-Antikörper können nach der XenoMouse-Technologie bereitgestellt werden, wie in der WO9110741, WO9402602, WO9633735 beschrieben. Ein gemäß dieser Technologie hergestellter, in der klinischen Erprobung befindlicher Antikörper ist beispielsweise auch ABX-EGF (Abgenix, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2001, 38: 17-23; Cancer Research 1999, 59: 1236-43).

Antikörper: Antikörper oder Immunglobulin wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung im breitesten Umfang verwendet und betrifft insbesondere polyklonale Antikörper und multispezifische Antikörper (z.B. bispezifische Antikörper) und besonders bevorzugt intakte monoklonale

Antikörper (Mab), die biologisch wirksam sind, sowie deren Varianten und Fragmente. Es sind auch Heteroantikörper, die aus zwei oder mehreren Antikörpern oder deren Fragmenten bestehen und/oder verschiedene Bindungsspezifitäten aufweisen und miteinander verbunden sind, umfasst.

5 In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz ihrer konstanten Regionen können Antikörper verschiedenen „Antikörper- (Immunglobulin-) Klassen zugeordnet werden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Mehrere davon können weiter in Subklassen (Isotypen) unterteilt werden, beispielsweise IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 und IgA2. Antikörper haben gewöhnlich ein

10 Molekulargewicht von etwa 150 kDa, bestehen aus zwei identischen leichten Ketten (L) und zwei identischen schweren Ketten (H). Monoklonale Antikörper werden aus einer Population homogener Zellen erhalten. Sie sind hochspezifisch und gegen ein einziges Epitop gerichtet, während polyklonale Antikörper verschiedene Antikörper umfassen, die gegen

15 unterschiedliche Epitope gerichtet sind. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper umfassen beispielsweise die von Kohler und Milstein (Nature 256, 495 (1975)) und in Burdon et al., (1985) "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas", Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and

20 Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam beschriebene Hybridommethode. Sie können insbesondere durch bekannte rekombinante DNA-Techniken hergestellt werden (siehe z.B. US4816567). Monoklonale Antikörper können auch aus

25 Phagenantikörperbibliotheken isoliert werden beispielsweise mithilfe der in Clackson et al. (Nature, 352:624-628 (1991)) und Marks et al. (J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991)) beschriebenen Techniken.

Varianten und Fragmente: Bei Varianten (Muteine) von Antikörpern handelt es sich um strukturverwandte Proteine, beispielsweise solche, die

30 durch Modifikation der Primärsequenz (Aminosäuresequenz), durch Glycoengineering (Varianten der Glykosylierungsstellen bzw -strukturen, auch deglykosylierte Proteine), durch PEGylierung, durch Herstellung in

modifizierten Wirtszellen oder durch andere Techniken erhalten werden können. Erfindungsgemäße Varianten sind hierbei nicht auf die vorstehenden Beispiele beschränkt, sondern umfassen alle dem Fachmann bekannten Varianten erfindungsgemäßer Antikörper.

5 Bei Fragmenten (Teilsegmenten) von Antikörpern handelt es sich um Spaltungsprodukte von Antikörpern, die beispielsweise durch limitierte enzymatische Verdauung mithilfe von Papain, Pepsin und Plasmin oder durch gentechnische Herstellung der Teilsegmente gewonnen werden. Typische Teilsegmente sind beispielsweise das bivalente F(ab')<sub>2</sub>-  
10 Fragment, das monovalente Fab-Fragment sowie das Fc-Fragment. (Lottspeich F. , H. Zorbas (ed.). Bioanalytik, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, (1998) pp.1035). Erfindungsgemäße Fragmente sind hierbei nicht auf die vorstehenden Beispiele beschränkt, sondern umfassen alle dem Fachmann bekannten Fragmente  
15 erfindungsgemäßer Antikörper.

Pharmazeutische Zubereitung: Die Begriffe pharmazeutische Formulierung und pharmazeutische Zubereitung werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Synonyme verwendet.

20

Wie hier verwendet bezieht sich „pharmazeutisch verträglich“ auf Arzneimittel, Trägerstoffe, Hilfsstoffe, Stabilisatoren, Lösungsmittel und sonstige Agenzien, die die Verabreichung der daraus erhaltenen pharmazeutischen Zubereitungen ohne unerwünschte physiologische  
25 Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Schwindel, Verdauungsprobleme o.ä. an ein Säugetier ermöglichen .

30

Bei pharmazeutischen Zubereitungen zur parenteralen Verabreichung besteht die Forderung nach Isotonie, Euhydrie sowie nach Verträglichkeit und Sicherheit der Formulierung (geringe Toxizität), der eingesetzten Hilfsstoffe und des Primärpackmittels. Überraschenderweise haben erfindungsgemäße hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-

EGFR-Antikörpern vorzugsweise den Vorteil, dass eine direkte Verwendung möglich ist, da zur Herstellung physiologisch unbedenkliche Agenzien verwendet werden. Somit ist die Herstellung erfindungsgemäßer hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern bei vorzugsweise gleichzeitig hoher Ausbeute an nativem und pharmazeutisch unbedenklichem Protein hoher Reinheit, vorzugsweise einfach, zeitsparend und kostengünstig.

Bei der Ultrafiltration handelt es sich um ein druckgetriebenes semipermeable Membranverfahren zur Separation gelöster und suspendierter Materialien. Das Trennprinzip beruht auf der Größe und Ausmaß des Moleküls, d.h. Substanzen, die kleiner als die Porengröße sind, gelangen ins Filtrat (Permeat), während Substanzen, die größer als die Porengröße sind, im Retentat (Konzentrat) verbleiben. Die nötige Kraft, um die Trennung durchzuführen, kann beispielsweise durch Zentrifugalkräfte, eine Gas-Druckquelle (z.B. Stickstoff) oder eine Membranpumpe aufgebracht werden.

Erfindungsgemäße hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern können bevorzugt hergestellt werden, indem eine erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper enthaltende Lösung mittels eines Ultrafiltrationsverfahrens aufkonzentriert wird. Zweckmäßigerweise wird hierzu einer Lösung mit einer definierten Konzentration an erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpern (beispielsweise für C225: 0,01 bis 150 mg/ml, bevorzugt 2 bis 100 mg/ml, besonders bevorzugt ca. 20 mg/ml, für EMD 72000: 0,01 bis 150 mg/ml, bevorzugt 5 bis 100 mg/ml, besonders bevorzugt ca 20 mg/ml), wie sie bei deren Herstellung gewonnen wird, in die Ultrafiltrationseinheit gegeben und unter definierten, kontrollierten Druckbedingungen einem Konzentrationsprozess unterzogen. Liegt der Antikörper als Feststoff, beispielsweise als Lyophilisat, vor, kann die erfindungsgemäße hochkonzentrierte, flüssige Formulierung hergestellt werden, indem erfindungsgemäße anti-EGFR-

Antikörper zunächst in Wasser oder einer einen oder mehrere der weiteren Inhaltsstoffe enthaltenden wässrigen Lösung gelöst und anschließend dem Ultrafiltrationsprozess ausgesetzt wird.

Das durch den Ultrafiltrationsprozess erhaltene Produkt kann  
5 anschließend durch Zusatz der weiter unten aufgeführten Hilfsstoffe stabilisiert werden. Die so erhaltene, den jeweiligen Antikörper enthaltende Lösung wird auf einen pH-Wert von 4 bis 10, bevorzugt pH 5 bis 9 eingestellt, steriltfiltriert und eventuell nach Bedarf durch einen nachfolgenden Lyophilisierungsschritt zur Stabilisierung in eine feste Form  
10 überführt.

Die Reihenfolge der Zugabe der verschiedenen Hilfsstoffe oder des erfindungsgemäßen Antikörpers ist weitgehend unabhängig vom Herstellungsverfahren und liegt im Ermessen des Fachmanns.

15 Die anti-EGFR-Antikörper liegen in erfindungsgemäßen hochkonzentrierten, flüssigen Formulierungen vorzugsweise in biologisch aktiver Form vor und es kommt bei erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise nicht zu einer Denaturierung der Antikörper. So bleibt die biologische Wirksamkeit des Proteins vorzugsweise erhalten.

20 In erfindungsgemäßen Verfahren können beispielsweise Polyethersulfon (PES) oder regenerierte Cellulose als Ultrafiltrations-Membranen verwendet werden: Der theoretisch denkbare Cutoff liegt im Bereich zwischen 5 und 500 kDa, vorzugsweise zwischen 10 und 100  
25 kDa, besonders bevorzugt zwischen 30 und 50 kDa.

Die für Ultrafree-Zentrifugenröhrchen (Millipore) verwandten Zentrifugalkräfte liegen im Bereich von 1 - 20000\*g, vorzugsweise im Bereich von 1000 - 12000\*g, besonders bevorzugt bei 2000\*g. Der bei  
30 der Amicon-Rührzelle (Millipore) angewandte Gasdruck liegt im Bereich von 0,1-5 psi, vorzugsweise bei 4 psi. Der bei der Labscale-TFF-Anlage (Millipore) angewandte Eingangsdruck liegt im Bereich von 0,1 – 85 psi,

vorzugsweise im Bereich von 10 – 30 psi, besonders bevorzugt bei 20 psi. Der bei der Labscale-TFF-Anlage (Millipore) angewandte Ausgangsdruck liegt im Bereich von 0,1 – 85 psi, vorzugsweise im Bereich von 5 – 20 psi, besonders bevorzugt bei 10 psi.

5

In erfindungsgemäßen Verfahren können beispielsweise folgende Puffer verwendet werden: Phosphatpuffer: Na- (oder K-)Phosphat; möglicher pH ca 6,0 – 8,2; Citrat-Puffer: Na-Citrat oder Citronensäure, möglicher pH ca 2,2 – 6,5, Succinat-Puffer pH ca 4.8 – 6.3, Acetat-Puffer, z.B.

10

Natriumacetat, pH ca 2.5 – 6.0; Histidin-Puffer pH ca 6,0 – 7.8; Glutaminsäure pH 8,0 bis 10,2; Glycin (N,N-bis(2-Hydroxyethyl)glycin) pH ca. 8,6 bis 10,6; Glycinat-Puffer pH ca 6.5 – 7.5; Imidazol pH 6,2 bis 7,8; Kaliumchlorid pH ca. 1,0 bis 2,2; Lactat-Puffer pH ca 3.0 – 6.0; Maleat-Puffer pH ca 2.5 – 5.0; Tartrat-Puffer pH ca 3.0 – 5.0; Tris: pH ca 6.8 –

15

7.7; Phosphat-Citrat-Puffer. Es ist auch der Zusatz von Isotisierungsmitteln zur Isotonisierung denkbar (z.B. Na-(oder K-)Cl oder auch andere Salze).

In erfindungsgemäßen Verfahren können vorstehend genannte Puffer beispielsweise in folgenden Konzentrationen verwendet werden: 1mM bis 200 mM, bevorzugt 2 – 20 mM, besonders bevorzugt ca. 10 mM.

20

Vorzugsweise können nachfolgende pH-Bereiche verwendet werden: pH 4 – 10, bevorzugt ist pH = IEP +/- 2 pH-Einheiten (2 pH Einheiten um den isoelektrischen Punkt des Proteins).

25

Vorzugsweise können nachfolgende Isotonisierungsmittel verwendet werden (übliche Konzentrationen): Natriumchlorid ca. 5 mM - 305 mM; Kaliumchlorid; Glucose; Glycerin; Dextrose 4-5.5 mM; Natriumsulfat 1-1.6 mM.

30

Vorzugsweise können nachfolgende Stoffe zur Viskositätserniedrigung verwendet werden: Natriumchlorid, Argininhydrochlorid,



Natriumthiocyanat, Ammoniumthiocyanat, Ammoniumsulfat,  
Ammoniumchlorid, Calciumchloride, Zinkchloride, Natriumacetat.

Vorzugsweise können nachfolgende Stabilisatoren verwendet werden:

5

1) Aminosäuren

(ca. 1 – 100 mg/ml, besonders bevorzugt 3-10 mg/ml, als Hydrochlorid)  
Arginin, Ornithin, Lysin, Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure,  
Isoleucin, Leucin, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin,  
Serin, Prolin.

10

2) Zucker und Zuckeralkohole

(ca. 1 – 200 mg/ml, besonders bevorzugt 30-65 mg/ml) Saccharose,  
Lactose, Glucose, Mannose, Maltose, Galactose, Fructose, Sorbose,  
Raffinose, Trehalose, Glucosamin, N-Methylglucosamin, Galactosamin,  
Neuraminsäure.

15

3) Antioxidantien

Acetonnatriumbisulfit 0.2%, Ascorbinsäure 0.01%, Ascorbinsäureester  
0.015%, Butylhydroxyanisol (BHA) 0.02%, Butylhydroxytoluen (BHT)  
0.02%, Cystein 0.5%, Nordihydroguaiaretinsäure (NDGA) 0.01%,  
Monothioglycerol 0.5%, Natriumbisulfit 0.15%, Natriummetabisulfit 0.2%,  
Tocopherole 0.5%, Glutathion 0.1%.

20

4) Konservierungsmittel

m-Cresol ca 0,1 - 0,3%, Chlrocresol ca. 0,1 - 0,3%, Phenol ca. 0,5%,  
Benzylalkohol ca. 1,0 – 2,0 %, Methylparaben ca. 0,2 %, Propylparaben  
ca. 0,02%, Butylparaben ca. 0,015%, Chlorbutanol ca. 0,25 - 0,5%,  
Phenylmercurinitrat ca. 0,002%, Phenylmercuriacetat ca. 0,002%,  
Thimersal ca. 0,01 - 0,02%, Benzalkoniumchlorid ca. 0,01%,  
Benzethoniumchlorid ca. 0,01%.

25

5) Cyclodextrine

z.B. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, Sulfobutylethyl- $\beta$ -cyclodextrin,  $\gamma$ -  
Cyclodextrin.

30

6) Albumine

Humanes Serum Albumin (HSA), Bovines Serum Albumin (BSA):

7) Polyhydric Alcohols

Glycerol, Ethanol, Mannitol.

8) Salts

- 5     Acetat-Salts (z.B. Natriumacetat), Magnesiumchlorid, Calciumchlorid,  
Tromethamin, EDTA (z.B. Na-EDTA).

- 10    Die Erfindung umfasst auch alle dem Fachmann bekannten und  
denkbaren Hydrate, Salts und Derivate der vorstehend genannten  
Agenzien.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind hochkonzentrierte, flüssige  
Formulierungen enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper  
und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente. Diese  
15    hochkonzentrierten, flüssigen Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern  
können durch oben beschriebene Ultrafiltrationsverfahren hergestellt  
werden. Weitere denkbare Verfahren zur Aufkonzentrierung sind  
chromatographische Verfahren, wie beispielsweise  
Größenausschlusschromatographie (z.B. Gelfiltration),  
20    Affinitätschromatographie (z.B. Protein A-Chromatographie) oder  
Ionenaustauschchromatographie, Membrantrennverfahren wie  
beispielsweise Dialyse, Elektrodialyse, Mikrofiltration, Umkehrosmose,  
elektrophoretische Verfahren oder Trocknungsverfahren wie  
beispielsweise Stickstoffgastrocknung, Vakuumofen-Trocknung,  
25    Lyophilisation, Waschen in organischen Lösungsmitteln und  
anschließender Lufttrocknung, Flüssigbettrocknung,  
Wirbelschichtrocknung, Sprühtrocknung, Walzentrocknung,  
Lagentrocknung, Lufttrocknung bei Raumtemperatur und anschließender  
Rekonstitution in einem geringeren Volumen an Lösungsmittel.

- 30    Erfindungsgemäße hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-  
EGFR-Antikörpern sind insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass sie

einen Gehalt wenigstens eines anti-EGFR-Antikörpers von 10 – 250 mg/ml, bevorzugt von 50 – 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 – 150 mg/ml aufweisen.

- 5 Erfindungsgemäße hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen sind insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass die anti-EGFR-Antikörper monoklonal sind und muriner oder humaner Herkunft, bevorzugt muriner Herkunft und chimär oder humanisiert. Besonders bevorzugt sind die anti-EGFR-Antikörper Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000)
- 10 und/oder deren Varianten und/oder Fragmente.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente erhältlich durch
- 15 erfindungsgemäße Verfahren, d.h. durch oben beschriebene Verfahren der Ultrafiltration.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem erfindungsgemäße, hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern als
- 20 lagerstabile Arzneimittel.

- Erfindungsgemäße, hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern können neben erfindungsgemäßen Antikörpern gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere
- 25 pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

- Vorzugsweise ermöglichen erfindungsgemäße Verfahren, hochkonzentrierte Formulierungen herzustellen, ohne dass es zu ungünstigen unerwünschten Aggregationen der erfindungsgemäßen
- 30 Antikörper kommt. So lassen sich mithilfe erfindungsgemäßer erfindungsgemäßer Verfahren applikationsfertige Lösungen mit hohem Wirkstoffanteil herstellen. In jüngerer Zeit werden vermehrt möglichst

hochkonzentrierte Formulierungen von Proteinwirkstoffen gefordert. Die meisten Antikörper, die zur Therapie eingesetzt werden, werden im Bereich mg/kg dosiert. Eine hohe Dosis und geringe zu applizierende Volumina (z.B. ca. 1 bis 1,5 ml bei subkutaner Applikation) zeigen den Bedarf an hochkonzentrierten Proteinzubereitungen mit Konzentrationen von mehr als 100 mg/ml. Außerdem können hochkonzentrierte Proteinformulierungen in präklinischen Tests zur Untersuchung der Unbedenklichkeit und Wirksamkeit in-vitro und in-vivo (am Tiermodell), in klinischen Tests zur Untersuchung der Unbedenklichkeit und Wirksamkeit beim Menschen und in der klinischen Anwendung des Produktes (insbesondere bei der subkutanen Applikation) erhebliche Vorteile aufweisen. Ihre Vorteile bestehen insbesondere darin, dass ein geringeres Volumen der Zubereitung angewendet werden muss. Im Gegensatz zur Infusion oder Injektion von relativ niedrig konzentrierten Proteinarzneimitteln ist dadurch z.B. eine subkutane Applikation von Proteinarzneimitteln für den Patienten möglich. Die subkutane Applikation von Proteinarzneimitteln kann verschiedene Gründe haben. Beispielsweise kann ein spezielles Targeting erwünscht sein, welches in Zusammenhang mit einem „therapeutischen Fenster“ steht. Des weiteren hat eine subkutane Applikation den Vorteil, dass der Patient selbst die Applikation vornehmen kann, ohne auf ärztliches Personal angewiesen zu sein. Das Beispiel des Insulins zeigt deutlich diese Vorteile. Da die Injektionen zur subkutanen Applikation jedoch maximal 1 - 1,5 ml betragen können, sind häufig hochkonzentrierte Proteinformulierungen mit mehr als 100 mg/ml nötig.

Überraschenderweise lassen sich mithilfe erfindungsgemäßer Verfahren hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern erhalten, die die bei Proteinkonzentrationen von 10 – 250 mg/ml, bevorzugt von 50 – 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 – 150 mg/ml nicht obengenannte Nachteile aufweisen.

Die Grenze bei bekannten hochkonzentrierten Formulierungen von Immunglobulinen liegt bei gebrauchsfertigen flüssigen Formulierungen von Antikörpern normalerweise bei 2 – 50 mg/ml (Humira®)

5 Mit den erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich jedoch auch deutlich höher konzentrierte und dennoch stabile Formulierungen herstellen, was nicht zu erwarten war. Somit können durch erfindungsgemäße Verfahren hochkonzentrierte stabile Antikörperformulierungen erhalten werden, die eine verringerte Viskosität und Aggregationstendenz verglichen mit bekannten hochkonzentrierten, flüssigen Antikörperformulierungen und  
10 dadurch dadurch die Handhabbarkeit bei der parenteralen Verabreichung erleichtert wird.

Vorteilhaft können aus den erfindungsgemäßen Formulierungen antikörperhaltige Lösungen mit einem pH-Wert von 4 bis 10, bevorzugt mit  
15 einem pH-Wert von 5 bis 9, und einer Osmolalität von 250 bis 350 mOsmol/kg hergestellt werden. Erfindungsgemäße Formulierungen können somit weitgehend schmerzfrei intravenös, intraarteriell und auch subkutan direkt verabreicht werden. Daneben kann die Zubereitung auch Infusionslösungen, wie z.B. Glukoselösung, isotonische Kochsalzlösung  
20 oder Ringerlösung, die auch weitere Wirkstoffe enthalten können, zugesetzt werden, so dass auch größere Wirkstoffmengen appliziert werden können.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen sind physiologisch gut verträglich,  
25 leicht herstellbar, exakt dosierbar und vorzugsweise über die Dauer der Lagerung sowie des Transports und bei mehrfachen Einfrier- und Auftauvorgängen hinsichtlich Gehalt, Zersetzungsprodukten und Aggregaten stabil. Sie können bei Kühlschranktemperatur (2-8°C) und bei Raumtemperatur (23-27°C) und 60% relativer Luftfeuchtigkeit (r.F.) über  
30 einen längeren Zeitraum vorzugsweise stabil gelagert werden. Vorzugsweise sind erfindungsgemäße Formulierungen auch bei höheren Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten vergleichsweise stabil.

Der Ausdruck "wirksame Menge" bedeutet die Menge eines Arzneimittels oder eines pharmazeutischen Wirkstoffes, die eine biologische oder medizinische Antwort in einem Gewebe, System, Tier oder Menschen hervorruft, die z.B. von einem Forscher oder Mediziner gesucht oder angestrebt wird.

Darüber hinaus bedeutet der Ausdruck "therapeutisch wirksame Menge" eine Menge, die, verglichen zu einem entsprechenden Subjekt, das diese Menge nicht erhalten hat, folgendes zur Folge hat: verbesserte Heilbehandlung, Heilung, Prävention oder Beseitigung einer Krankheit, eines Krankheitsbildes, eines Krankheitszustandes, eines Leidens, einer Störung oder Verhinderung von Nebenwirkungen oder auch die Verminderung des Fortschreitens einer Krankheit, eines Leidens oder einer Störung. Die Bezeichnung "therapeutisch wirksame Menge" umfasst auch die Mengen, die wirkungsvoll sind, die normale physiologische Funktion zu erhöhen.

Arzneimittel können in Form von Dosiseinheiten, die eine vorbestimmte Menge an Wirkstoff pro Dosiseinheit enthalten, dargereicht werden. Eine solche Einheit kann beispielsweise 0,5 mg bis 1 g, vorzugsweise 1 mg bis 800 mg, eines erfindungsgemäßen Wirkstoffs enthalten, je nach dem behandelten Krankheitszustand, dem Verabreichungsweg und dem Alter, Gewicht und Zustand des Patienten. Bevorzugte Dosierungseinheitsformulierungen sind solche, die eine Tagesdosis oder Teildosis, wie oben angegeben, oder einen entsprechenden Bruchteil davon eines Wirkstoffs enthalten. Weiterhin lassen sich solche Arzneimittel mit einem der im pharmazeutischen Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren herstellen.

Arzneimittel lassen sich zur Verabreichung über einen beliebigen geeigneten Weg, beispielsweise auf oralem (einschließlich buccalem bzw. sublingualen), rektalem, pulmonalen, nasalem, topischem (einschließlich

buccalem, sublingualem oder transdermalem), vaginalem oder parenteralem (einschließlich subkutanem, intramuskulärem, intravenösem oder intradermalem) Wege, anpassen. Solche Arzneimittel können mit allen im pharmazeutischen Fachgebiet bekannten Verfahren hergestellt werden, indem beispielsweise der Wirkstoff mit dem bzw. den Trägerstoff(en) oder Hilfsstoff(en) zusammengebracht wird.

Zur Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneimittel eignet sich vorzugsweise die parenterale Applikation. Im Falle der parenteralen Applikation sind die intravenöse, subkutane oder intradermale Applikation besonders bevorzugt. Im Falle der intravenösen Applikation kann die Injektion direkt oder auch als Zusatz zu Infusionslösungen erfolgen.

Insbesondere eignen sich erfindungsgemäße Arzneimittel zur subkutanen oder intradermalen Applikation, da sich mithilfe erfindungsgemäßer hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen die für subkutane Verabreichung erforderlichen gering zu applizierenden Volumina realisieren lassen.

Die subkutane Applikation hat den Vorteil, dass der Patient ohne medizinische fachmännische Hilfe sich selbst das Arzneimittel verabreichen kann. Erfindungsgemäße Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern eignen sich auch zur Herstellung von parenteral zu applizierenden Arzneimitteln mit kontrollierter, gleichmäßiger und/oder verzögerter Wirkstofffreisetzung (slow-release, sustained-release, controlled release), beispielsweise auch zur Herstellung von Depot-Formulierungen, die für den Patienten vorteilhaft sind, da eine Applikation nur in größeren Zeitintervallen notwendig ist. Erfindungsgemäße pharmazeutische Zubereitungen können auch direkt in den Tumor injiziert werden und so direkt am bestimmungsgemäßen Wirkort ihre Wirkung entfalten.

Zu den an die parenterale Verabreichung angepassten Arzneimitteln gehören wässrige und nichtwässrige sterile Injektionslösungen, die Antioxidantien, Puffer, Bakteriostatika und Solute, durch die die Formulierung isotonisch mit dem Blut des zu behandelnden Empfängers gemacht wird, enthalten; sowie wässrige und nichtwässrige sterile Suspensionen, die Suspensionsmittel und Verdicker enthalten können. Die Formulierungen können in Einzeldosis- oder Mehrfachdosisbehältern, z.B. versiegelten Ampullen und Fläschchen, dargereicht und in gefriergetrocknetem (lyophilisiertem) Zustand gelagert werden, so dass nur die Zugabe der sterilen Trägerflüssigkeit, z.B. Wasser für Injektionszwecke, unmittelbar vor Gebrauch erforderlich ist. Rezepturmäßig hergestellte Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen Pulvern, Granulaten und Tabletten hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern lassen sich auch in Form von Liposomenzuführsystemen, wie z.B. kleinen unilamellaren Vesikeln, großen unilamellaren Vesikeln und multilamellaren Vesikeln, verabreichen. Liposomen können aus verschiedenen Phospholipiden, wie z.B. Cholesterin, Stearylamin oder Phosphatidylcholin, gebildet werden.

An die topische Verabreichung angepasste Arzneimittel können als Salben, Cremes, Suspensionen, Lotionen, Lösungen, Pasten, Gele, Sprays, Aerosole oder Öle formuliert sein, in die erfindungsgemäße Formulierungen eingebracht werden.

Für Behandlungen des Auges oder anderer äußerer Gewebe, z.B. Mund und Haut, werden die Formulierungen vorzugsweise in topische Salbe oder Creme eingebracht und appliziert. Bei Formulierung zu einer Salbe können erfindungsgemäße Formulierungen entweder in eine paraffinische oder einer mit Wasser mischbare Cremebasis eingebracht werden. Alternativ kann eine erfindungsgemäße Formulierung zu einer Creme mit



einer Öl-in-Wasser-Cremebasis oder einer Wasser-in-Öl-Basis formuliert werden.

5 Zu den an die topische Applikation am Auge angepassten Arzneimitteln gehören Augentropfen.

An die rektale Verabreichung angepasste Arzneimittel können in Form von Zäpfchen oder Einläufen dargereicht werden.

10 An die Verabreichung durch Inhalation angepasste Arzneimittel umfassen feinpartikuläre Stäube oder Nebel, die mittels verschiedener Arten von unter Druck stehenden Dosierspendern mit Aerosolen, Verneblern oder Insufflatoren erzeugt werden können.

15 An die vaginale Verabreichung angepasste Arzneimittel können als Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Sprayformulierungen dargereicht werden.

20 Es versteht sich, dass die erfindungsgemäßen Arzneimittel neben den obigen besonders erwähnten Bestandteilen andere im Fachgebiet übliche Mittel mit Bezug auf die jeweilige Art der pharmazeutischen Formulierung enthalten können.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Sets (Kits) bestehend aus getrennten Packungen von

- a) einer erfindungsgemäßen Formulierung, enthaltend eine wirksame Menge eines anti-EGFR-Antikörpers, bevorzugt eines monoklonalen anti-EGFR-Antikörpers, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten
- 30 oder Fragmenten, und
- b) einer Formulierung, enthaltend eine wirksamen Menge eines weiteren Arzneimittelwirkstoffs.

Das Set enthält geeignete Behälter, wie Schachteln oder Kartons, individuelle Flaschen, Beutel oder Ampullen. Das Set kann z.B. separate Ampullen enthalten, in denen jeweils eine erfindungsgemäße  
5 Formulierung, enthaltend eine wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpers und einer Formulierung eines weiteren Arzneimittelwirkstoffs in gelöster oder in lyophilisierter Form vorliegt.

Eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-  
10 EFGR-Antikörpers hängt von einer Reihe von Faktoren ab, einschließlich z.B. dem Alter und Gewicht des Patienten, dem exakten Krankheitszustand, der der Behandlung bedarf, sowie seines Schweregrads, der Beschaffenheit der Formulierung sowie dem Verabreichungsweg, und wird letztendlich von dem behandelnden Arzt  
15 bzw. Tierarzt festgelegt. Jedoch liegt eine wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-EFGR-Antikörpers für die Behandlung von neoplastischem Wachstum, z.B. Dickdarm- oder Brustkarzinom, im allgemeinen im Bereich von 0,1 bis 100 mg/kg Körpergewicht des Empfängers (Säugers) pro Tag und besonders typisch im Bereich von 1  
20 bis 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Somit läge für einen 70 kg schweren erwachsenen Säuger die tatsächliche Menge pro Tag für gewöhnlich zwischen 70 und 700 mg, wobei diese Menge als Einzeldosis pro Tag oder üblicher in einer Reihe von Teildosen (wie z.B. zwei, drei, vier, fünf oder  
25 sechs) pro Tag gegeben werden kann, so dass die Gesamttagesdosis die gleiche ist. Die Bestimmung des geeigneten Antikörper-Titers erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden. Die für die Verabreichung vorgesehe Dosierung ist im Allgemeinen ausreichend, um die gewünschte tumor-hemmende Wirkung zu erzielen. Die Dosierung sollte jedoch auch  
30 möglichst gering gewählt werden, so dass keine Nebenwirkungen, wie unerwünschte Kreuzreaktionen, anaphylaktische Reaktionen o.ä. auftreten.

Erfindungsgemäße Medikamente können insbesondere zur Prophylaxe und/oder zur Behandlung von Krankheiten und Krankheitszuständen verwendet werden.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumoren und/oder Tumormetastasen, wobei der Tumor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Gehirntumor, Tumor  
10 des Urogenitaltrakts, Tumor des lymphatischen Systems, Magentumor, Kehlkopftumor, Monozytenleukämie, Lungenadenokarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Glioblastom und Brustkarzinom.

15 In verschiedenen in vitro und in vivo Studien konnte gezeigt werden, dass die Blockade des EGFR durch Antikörper auf unterschiedlichen Ebenen gegen Tumore, beispielsweise durch Hemmung der Krebszellproliferation, Verringerung der tumorvermittelten Angiogenese, Induktion der Krebszellapoptose und Verstärkung der toxischen Wirkungen der  
20 Strahlentherapie und der herkömmlichen Chemotherapie.

Arzneimittel enthaltend erfindungsgemäße Formulierungen können EGFR wirksam regulieren, modulieren oder hemmen und können deshalb zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Erkrankungen im Zusammenhang  
25 mit unregulierter oder gestörter EGFR-Aktivität eingesetzt werden. Insbesondere lassen sich die erfindungsgemäßen Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern deshalb bei der Behandlung gewisser Krebsformen einsetzen, sowie bei durch pathologische Angiogenese bedingten Erkrankungen wie diabetische Retinopathie oder Entzündungen.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb die Verwendung von erfindungsgemäßen Formulierungen zur Herstellung eines Medikaments

zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, die durch EGFR und/oder durch EGFR-vermittelte Signaltransduktion verursacht, vermittelt und/oder propagiert werden.

5 Erfindungsgemäße Arzneimittel eignen sich besonders zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs, einschließlich solider Karzinome, wie zum Beispiel Karzinome (z.B. der Lungen, des Pankreas, der Schilddrüse, der Harnblase oder des Kolons), myeloische Erkrankungen (z.B. myeloische Leukämie) oder Adenome (z.B. villöses Kolonadenom), pathologische  
10 Angiogenese und metastatische Zellmigration. Die Arzneimittel sind ferner nützlich bei der Behandlung der Komplementaktivierungs-abhängigen chronischen Entzündung (Niculescu et al. (2002) Immunol. Res., 24:191-199) und durch HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Typ 1) induzierte Immunschwäche (Popik et al. (1998) J Virol, 72: 6406-6413).

15 Außerdem eignen sich die vorliegenden Arzneimittel als pharmazeutische Wirkstoffe für Säugetiere, insbesondere für den Menschen, bei der Behandlung von EGFR-bedingten Krankheiten. Der Ausdruck „EGFR-bedingte Krankheiten “ bezieht sich auf pathologische Zustände, die von  
20 der EGFR-Aktivität abhängig sind. EGFR ist entweder direkt oder indirekt an den Signaltransduktionswegen verschiedener Zellaktivitäten, darunter Proliferation, Adhäsion und Migration sowie Differenzierung beteiligt. Zu den Krankheiten, die mit EGFR-Aktivität assoziiert sind, zählen die Proliferation von Tumorzellen, die pathologische Gefäßneubildung, die das  
25 Wachstum fester Tumore fördert, Gefäßneubildung im Auge (diabetische Retinopathie, altersbedingte Makula-Degeneration und dergleichen) sowie Entzündung (Schuppenflechte, rheumatoide Arthritis und dergleichen).

Gewöhnlich werden die hier besprochenen Erkrankungen in zwei Gruppen  
30 eingeteilt, in hyperproliferative und nicht-hyperproliferative Erkrankungen. In diesem Zusammenhang werden Psoriasis, Arthritis, Entzündungen, Endometriose, Vernarbung, gutartige Prostatahyperplasie, immunologi-

sche Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und Immunschwächekrankheiten als nicht-krebsartige Krankheiten angesehen, von denen Arthritis, Entzündung, immunologische Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und Immunschwächekrankheiten gewöhnlich als nicht-hyperproliferative Erkrankungen angesehen werden.

In diesem Zusammenhang sind Hirnkrebs, Lungenkrebs, Plattenepithelkrebs, Blasenkrebs, Magenkrebs, Pankreaskrebs, Leberkrebs, Nierenkrebs, Kolorektalkrebs, Brustkrebs, Kopfkrebs, Halskrebs, Ösophaguskrebs, gynäkologischer Krebs, Schilddrüsenkrebs, Lymphome, chronische Leukämie und akute Leukämie als krebsartige Erkrankungen anzusehen, die alle gewöhnlich zur Gruppe der hyperproliferative Erkrankungen gezählt werden. Insbesondere krebsartiges Zellwachstum und insbesondere durch EGFR direkt oder indirekt vermitteltes krebsartiges Zellwachstum ist eine Erkrankung, die ein Ziel der vorliegenden Erfindung darstellt.

Es kann gezeigt werden, dass die erfindungsgemäßen Arzneimittel in einem Xenotransplantat-Tumor-Modell eine in vivo antiproliferative Wirkung aufweisen. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden an einen Patienten mit einer hyperproliferativen Erkrankung verabreicht, z. B. zur Inhibition des Tumorwachstums, zur Verminderung der mit einer lymphoproliferativen Erkrankung einhergehenden Entzündung, zur Inhibition der Transplantatabstoßung oder neurologischer Schädigung aufgrund von Gewebereparatur usw. Die vorliegenden Arzneimittel sind nützlich für prophylaktische oder therapeutische Zwecke. Wie hierin verwendet, wird der Begriff „behandeln“ als Bezugnahme sowohl auf die Verhinderung von Krankheiten als auch die Behandlung vorbestehender Leiden verwendet. Die Verhinderung von Proliferation wird durch Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneimittel vor Entwicklung der evidenten Krankheit, z. B. zur Verhinderung des Tumorwachstums, Verhinderung metastatischen Wachstums, der Herabsetzung von mit kardiovaskulärer

Chirurgie einhergehenden Restenosen usw. erreicht. Als Alternative werden die Arzneimittel zur Behandlung andauernder Krankheiten durch Stabilisation oder Verbesserung der klinischen Symptome des Patienten verwendet.

5

Der Wirt oder Patient kann jeglicher Säugerspezies angehören, z.B. einer Primatenspezies, besonders Menschen; Nagetieren, einschließlich Mäusen, Ratten und Hamstern; Kaninchen; Pferden, Rindern, Hunden, Katzen usw. Tiermodelle sind für experimentelle Untersuchungen von Interesse, wobei sie ein Modell zur Behandlung einer Krankheit des Menschen zur Verfügung stellen.

10

15

Die Empfänglichkeit einer bestimmten Zelle gegenüber der Behandlung mit den erfindungsgemäßen Arzneimitteln kann durch in vitro-Tests bestimmt werden. Typischerweise wird eine Kultur der Zelle mit einem erfindungsgemäßen Arzneimittel bei verschiedenen Konzentrationen für eine Zeitdauer inkubiert, die ausreicht, um den Wirkstoffen zu ermöglichen, Zelltod zu induzieren oder Migration zu inhibieren, gewöhnlich zwischen ungefähr einer Stunde und einer Woche. Zu in vitro-Tests können kultivierte Zellen aus einer Biopsieprobe verwendet werden. Die nach der Behandlung zurückbleibenden lebensfähigen Zellen werden dann gezählt.

20

25

Die Dosis variiert abhängig von den verwendeten spezifischen Arzneimitteln, der spezifischen Erkrankung, dem Patientenstatus usw.. Typischerweise ist eine therapeutische Dosis ausreichend, um die unerwünschte Zellpopulation im Zielgewebe erheblich zu vermindern, während die Lebensfähigkeit des Patienten aufrechterhalten wird. Die Behandlung wird im Allgemeinen fortgesetzt, bis eine erhebliche Reduktion vorliegt, z. B. mindestens ca. 50 % Verminderung der spezifischen Zellzahl und kann fortgesetzt werden, bis im Wesentlichen keine unerwünschten Zellen mehr im Körper nachgewiesen werden.

30

Zur Identifikation von EGFR-Inhibitoren stehen verschiedene Assay-Systeme zur Verfügung. Beim Scintillation-Proximity-Assay (Sorg et al., J. of Biomolecular Screening, 2002, 7, 11-19) und dem FlashPlate-Assay wird die radioaktive Phosphorylierung eines Proteins oder Peptids als

Substrat mit  $\gamma$ ATP gemessen. Bei Vorliegen einer inhibitorischen Verbindung ist kein oder ein vermindertes radioaktives Signal nachweisbar. Ferner sind die Homogeneous Time-resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer- (HTR-FRET-) und Fluoreszenzpolarisations- (FP-) Technologien als Assay-Verfahren nützlich (Sills et al., J. of Biomolecular Screening, 2002, 191-214).

Andere nicht radioaktive ELISA-Assay-Verfahren verwenden spezifische Phospho-Antikörper (Phospho-AK). Der Phospho-AK bindet nur das phosphorylierte Substrat. Diese Bindung ist mit einem zweiten Peroxidase-konjugierten Anti-Schaf-Antikörper durch Chemilumineszenz nachweisbar (Ross et al., 2002, Biochem. J., unmittelbar vor der Veröffentlichung, Manuskript BJ20020786).

Es gibt viele mit einer Deregulation der Zellproliferation und des Zelltods (Apoptose) einhergehende Erkrankungen und Krankheitszustände. Die Erkrankungen und Krankheitszustände, die durch erfindungsgemäße Arzneimittel behandelt, verhindert oder gelindert werden können umfassen die nachfolgend aufgeführten Erkrankungen und Krankheitszustände, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel sind nützlich bei der Behandlung und/oder Prophylaxe einer Reihe verschiedener Erkrankungen und Krankheitszustände, bei denen Proliferation und/oder Migration glatter Muskelzellen und/oder Entzündungszellen in die Intimaschicht eines Gefäßes vorliegt, resultierend in eingeschränkter Durchblutung dieses Gefäßes, z. B. bei neointimalen okklusiven Läsionen. Zu okklusiven Transplantat-Gefäßerkrankungen von Interesse zählen Atherosklerose,

koronare Gefäßerkrankung nach Transplantation, Venentransplantatstenose, peri-anastomotische Prothesenrestenose, Restenose nach Angioplastie oder Stent-Platzierung und dergleichen.

- 5 Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung der erfindungsgemäßen Arzneimittel zur Behandlung oder Vorbeugung von Krebs. Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist deshalb die Verwendung erfindungsgemäßer flüssiger Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder
- 10 Prophylaxe von Tumoren und/oder Tumormetastasen, wobei der Tumor besonders bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Gehirntumor, Tumor des Urogenitaltrakts, Tumor des lymphatischen Systems, Magentumor, Kehlkopftumor, Monozytenleukämie, Lungenadenokarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom,
- 15 Bauchspeicheldrüsenkrebs, Glioblastom und Brustkarzinom, ohne darauf beschränkt zu sein.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen Arzneimittel zur Herstellung eines Medikaments zur
- 20 Behandlung von Krankheiten, ausgewählt aus der Gruppe der krebsartigen Erkrankungen bestehend aus Plattenepithelkrebs, Blasenkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs, Nierenkrebs, Kolorektalkrebs, Brustkrebs, Kopfkrebs, Halskrebs, Ösophaguskrebs, gynäkologischem Krebs, Schilddrüsenkrebs, Lymphom, chronischer Leukämie und akuter
- 25 Leukämie.

- Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können an Patienten zur Behandlung von Krebs verabreicht werden. Die vorliegenden Arzneimittel hemmen die Tumorangiogenese und beeinflussen so das Wachstum von Tumoren (J. Rak et al. Cancer Research, 55:4575-4580, 1995). Die
- 30 angiogenesehemmenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen



Arzneimittel eignen sich auch zur Behandlung bestimmter Formen von Blindheit, die mit Retina-Gefäßneubildung in Zusammenhang stehen.

5 Gegenstand der Erfindung ist deshalb außerdem die Verwendung erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, die durch Angiogenese verursacht, vermittelt und/oder propagiert werden.

10 Eine derartige Krankheit, an der Angiogenese beteiligt ist, ist eine Augenkrankheit, wie Retina-Vaskularisierung, diabetische Retinopathie, altersbedingte Makula-Degeneration und dergleichen.

15 Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Retina-Vaskularisierung, diabetischer Retinopathie, altersbedingter Makula-Degeneration und/oder Entzündungskrankheiten.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Kontaktdermatitis, 25 Spät-Typ der Überempfindlichkeitsreaktion, Entzündungen, Endometriose, Vernarbung, gutartiger Prostatahyperplasie, immunologischer Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und Immunschwächekrankheiten.

30 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Knochen-Pathologien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Osteosarkom, Osteoarthritis und Rachitis.

Weiterhin können die erfindungsgemäße Arzneimittel verwendet werden, um bei gewissen existierenden Krebschemotherapien und -bestrahlungen additive oder synergistische Effekte bereitzustellen, und/oder können dazu  
5 verwendet werden, um die Wirksamkeit gewisser existierender Krebschemotherapien und -bestrahlungen wiederherzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur  
10 Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, wobei eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpers in Kombination mit einer Verbindung aus der Gruppe 1) Östrogenrezeptormodulator, 2) Androgen-  
rezeptormodulator, 3) Retinoidrezeptormodulator, 4) Zytotoxikum, 5)  
15 antiproliferatives Mittel, 6) Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, 7) HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, 8) HIV-Protease-Inhibitoren, 9) Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, 10) Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibitoren sowie 11) Angiogenese-Inhibitoren verabreicht wird.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur  
20 Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, wobei eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpers in Kombination mit  
25 Radiotherapie und einer Verbindung aus der Gruppe 1) Östrogenrezeptormodulator, 2) Androgenrezeptormodulator, 3) Retinoidrezeptormodulator, 4) Zytotoxikum, 5) antiproliferatives Mittel, 6) Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, 7) HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, 8) HIV-Protease-Inhibitoren, 9) Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, 10)  
30 Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibitoren sowie 11) Angiogenese-Inhibitoren verabreicht wird.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können so auch gemeinsam mit anderen gut bekannten Therapeutika, die aufgrund ihrer jeweiligen Eignung für das behandelte Leiden ausgewählt werden, verabreicht werden. So wären zum Beispiel bei Knochenleiden Kombinationen  
5 günstig, die antiresorptiv wirkende Bisphosphonate, wie Alendronat und Risedronat, Integrinblocker (wie sie weiter unten definiert werden), wie  $\alpha\beta 3$ -Antagonisten, bei der Hormontherapie verwendete konjugierte Östrogene wie Prempro®, Premarin® und Endometrion®; selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) wie Raloxifen, Droloxifen, CP-  
10 336,156 (Pfizer) und Lasofoxifen, Kathepsin-K-Inhibitoren und ATP-Protonenpumpeninhibitoren enthalten.

Die vorliegenden Arzneimittel eignen sich auch zur Kombination mit bekannten Antikrebsmitteln. Zu diesen bekannten Antikrebsmitteln zählen die folgenden: Östrogenrezeptormodulatoren, Androgenrezeptor-  
15 modulatoren, Retinoidrezeptormodulatoren, Zytotoxika, antiproliferative Mittel, Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, HIV-Protease-Inhibitoren, Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Wachstumsfaktor-Inhibitoren sowie Angiogeneseinhibitoren. Die vorliegenden Verbindungen eignen sich insbesondere zur gemeinsamen  
20 Anwendung mit Radiotherapie.

„Östrogenrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die Bindung von Östrogen an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu den Östrogenrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Tamoxifen, Raloxifen,  
25 Idoxifen, LY353381, LY 117081, Toremifen, Fulvestrant, 4-[7-(2,2-Dimethyl-1-oxopropoxy-4-methyl-2-[4-[2-(1-piperidinyloxy)phenyl]-2H-1-benzopyran-3-yl)]phenyl-2,2-dimethylpropanoat, 4,4'-Dihydroxybenzophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon und SH646, was jedoch keine Einschränkung darstellen soll.

„Androgenrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die Bindung von Androgenen an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu den

Androgenrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Finasterid und andere 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren, Nilutamid, Flutamid, Bicalutamid, Liarozol und Abirateron-acetat.

„Retinoidrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die Bindung von Retinoiden an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu solchen Retinoidrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Bexaroten, Tretinoin, 13-cis-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure,  $\alpha$ -Difluormethylornithin, ILX23-7553, trans-N-(4'-Hydroxyphenyl)retinamid und N-4-Carboxyphenylretinamid.

„Zytotoxika“ bezieht sich auf Verbindungen, die in erster Linie durch direkte Einwirkung auf die Zellfunktion zum Zelltod führen oder die die Zellmyose hemmen oder diese stören, darunter Alkylierungsmittel, Tumornekrosefaktoren, interkalierende Mittel, Mikrotubulin-Inhibitoren und Topoisomerase-Inhibitoren.

Zu den Zytotoxika zählen zum Beispiel Tirapazimin, Sertenef, Cachectin, Ifosfamid, Tasonermin, Lonidamin, Carboplatin, Altretamin, Prednimustin, Dibromdulcit, Ranimustin, Fotemustin, Nedaplatin, Oxaliplatin, Temozolomid, Heptaplatin, Estramustin, Improsulfan-tosylat, Trofosfamid, Nimustin, Dibrospidium-chlorid, Pumitepa, Lobaplatin, Satraplatin, Profiromycin, Cisplatin, Irofulven, Dexifosfamid, cis-Amindichlor(2-methylpyridin)platin, Benzylguanin, Glufosfamid, GPX100, (trans,trans,trans)-bis-mu-(hexan-1,6-diamin)-mu-[diaminplatin(II)]bis[diamin(chlor)platin(II)]-tetrachlorid, Diarizidinylspermin, Arsentrioxid, 1-(11-Dodecylamino-10-hydroxyundecyl)-3,7-dimethylxanthin, Zorubicin, Idarubicin, Daunorubicin, Bisantren, Mitoxantron, Pirarubicin, Pinafid, Valrubicin, Amrubicin, Antineoplaston, 3'-Desamino-3'-morpholino-13-desoxo-10-hydroxycarminomycin, Annamycin, Galarubicin, Elnafid, MEN10755 und 4-Desmethoxy-3-desamino-3-aziridiny-4-methylsulfonyl-daunorubicin (siehe WO 00/50032), was jedoch keine Einschränkung darstellen soll.

Zu den Mikrotubulin-Inhibitoren zählen zum Beispiel Paclitaxel, Vindesin-sulfat, 3',4'-Dideshydro-4'-desoxy-8'-norvincal leukoblastin, Docetaxol,

Rhizoxin, Dolastatin, Mivobulin-isethionat, Auristatin, Cemadotin, RPR109881, BMS184476, Vinflunin, Cryptophycin, 2,3,4,5,6-pentafluor-N-(3-fluor-4-methoxyphenyl)benzolsulfonamid, Anhydrovinblastin, N,N-dimethyl-L-valyl-L-valyl-N-methyl-L-valyl-L-prolyl-L-prolin-t-butylamid, TDX258 und BMS188797.

Topoisomerase-Inhibitoren sind zum Beispiel Topotecan, Hycaptamin, Irinotecan, Rubitecan, 6-Ethoxypropionyl-3',4'-O-exo-benzyliden-chartreusin, 9-Methoxy-N,N-dimethyl-5-nitropyrazolo[3,4,5-kl]acridin-2-(6H)propanamin, 1-Amino-9-ethyl-5-fluor-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':b,7]indolizino[1,2b]chinolin-10,13(9H,15H)-dion, Lurtotecan, 7-[2-(N-Isopropylamino)ethyl]-(20S)camptothecin, BNP1350, BNPI1100, BN80915, BN80942, Etoposid-phosphat, Teniposid, Sobuzoxan, 2'-Dimethylamino-2'-desoxy-etoposid, GL331, N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-9-hydroxy-5,6-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazol-1-carboxamid, Asulacrin, (5a,5aB,8aa,9b)-9-[2-[N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-N-methylamino]ethyl]-5-[4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl]-5,5a,6,8,8a,9-hexahydrofuro(3',4':6,7)naphtho(2,3-d)-1,3-dioxol-6-on, 2,3-(Methylendioxy)-5-methyl-7-hydroxy-8-methoxybenzo[c]phenanthridinium, 6,9-Bis[(2-aminoethyl)amino]benzo[g]isochinolin-5,10-dion, 5-(3-Aminopropylamino)-7,10-dihydroxy-2-(2-hydroxyethylaminomethyl)-6H-pyrazolo[4,5,1-de]acridin-6-on, N-[1-[2(Diethylamino)ethylamino]-7-methoxy-9-oxo-9H-thioxanthen-4-ylmethyl]formamid, N-(2-(Dimethylamino)-ethyl)acridin-4-carboxamid, 6-[[2-(Dimethylamino)-ethyl]amino]-3-hydroxy-7H-indeno[2,1-c]chinolin-7-on und Dimesna.

Zu den „antiproliferativen Mitteln“ zählen Antisense-RNA- und -DNA-Oligonucleotide wie G3139, ODN698, RVASKRAS, GEM231 und INX3001, sowie Antimetaboliten wie Enocitabin, Carmofur, Tegafur, Pentostatin, Doxifluridin, Trimetrexat, Fludarabin, Capecitabin, Galocitabin, Cytarabin-ocfosfat, Fosteabin-Natriumhydrat, Raltitrexed, Paltitrexid, Emitefur, Tiazofurin, Decitabin, Nolatrexed, Pemetrexed, Nelzarabin, 2'-Desoxy-2'-methylidencytidin, 2'-Fluormethylen-2'-desoxycytidin, N-[5-(2,3-Dihydrobenzofuryl)sulfonyl]-N'-(3,4-dichlorphenyl)harnstoff, N6-[4-Desoxy-

4-[N2-[2(E),4(E)-tetradecadienoyl]glycylamino]-L-glycero-B-L-manno-  
heptopyranosyl]adenin, Aplidin, Ecteinasidin, Troxacitabine, 4-[2-Amino-  
4-oxo-4,6,7,8-tetrahydro-3H-pyrimidino[5,4-b][1,4]thiazin-6-yl-(S)-ethyl]-  
2,5-thienoyl-L-glutaminsäure, Aminopterin, 5-Flurouracil, Alanosin, 11-  
5 Acetyl-8-(carbamoyloxymethyl)-4-formyl-6-methoxy-14-oxa-1,11-diaza-  
tetracyclo(7.4.1.0.0)-tetradeca-2,4,6-trien-9-yllessigsäureester, Swainsonin,  
Lometrexol, Dexrazoxan, Methioninase, 2'-cyan-2'-desoxy-N4-palmitoyl-1-  
B-D-Arabinofuranosylcytosin und 3-Aminopyridin-2-carboxaldehyd-  
thiosemicarbazon. Die „antiproliferativen Mittel“ beinhalten auch andere  
10 monoklonale Antikörper gegen Wachstumsfaktoren als bereits unter den  
„Angiogenese-Inhibitoren“ angeführt wurden, wie Trastuzumab, sowie  
Tumorsuppressorgene, wie p53, die über rekombinanten virusvermittelten  
Gentransfer abgegeben werden können (siehe z.B. US-Patent Nr.  
6,069,134). Erfindungsgemäße Arzneimittel können auch in Kombination  
15 mit allen weiteren dem Fachmann bekannten therapeutischen Antikörpern  
oder im Zusammenhang mit obengenannter Krankheiten geeigneten  
pharmazeutischen Wirkstoffen verabreicht werden.

Weiterhin können erfindungsgemäße Formulierungen von anti-EGFR-  
20 Antikörpern zur Isolierung und zur Untersuchung der Aktivität oder  
Expression von EGFR verwendet werden. Außerdem eignen sie sich  
insbesondere zur Verwendung in diagnostischen Verfahren zu  
Erkrankungen im Zusammenhang mit unregulierter oder gestörter EGFR-  
Aktivität.

25 Für diagnostische Zwecke können erfindungsgemäße Antikörper  
beispielsweise radioaktiv markiert werden. Ein bevorzugtes  
Markierungsverfahren ist die Iodogen-Methode (Fraker et al., 1978). Für  
diagnostische Zwecke wird der Antikörper besonders bevorzugt als  
30 F(ab')<sub>2</sub> Fragment verwendet. Dadurch werden hervorragende Ergebnisse  
erzielt, so dass keine Hintergrund-Subtraktion notwendig ist. Solche  
Fragmente können nach bekannten Methoden hergestellt werden (e.g.,

Herlyn et al., 1983). Im Allgemeinen wird ein Pepsin-Verdau in bei saurem pH-Wert durchgeführt und die Fragmente durch Protein A-Sepharose<sup>TM</sup> Chromatographie von unverdaulichem IgG und Fragmenten schwerer Ketten getrennt.

5

Die anti-EGFR-Antikörper zeigen in erfindungsgemäßen Formulierungen bevorzugt eine vorteilhafte biologische Aktivität, die in Enzym-Assays, wie in den Beispielen beschrieben, leicht nachweisbar ist. In derartigen auf Enzymen basierenden Assays zeigen und bewirken die

10 erfindungsgemäßen Antikörper bevorzugt einen inhibierenden Effekt, der gewöhnlich durch IC<sub>50</sub>-Werte in einem geeigneten Bereich, bevorzugt im mikromolaren Bereich und bevorzugt im nanomolaren Bereich dokumentiert wird.

15

Nachweise von Proteingröße, struktureller Integrität, Reinheit oder Glykosylierungsmuster der erfindungsgemäßen der erfindungsgemäßen Antikörper in erfindungsgemäßen Formulierungen umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, SE-HPLC, Peptid-Mapping (Verdau), N-terminale Sequenzierung, SDS-Page, Tris-Glycin-Gradient-Gel (nicht-reduzierend),

20 FTIR-Methode (Fourier transform infrared spectra), CD (circular dichroism), RAMAN Spektroskopie, Kohlenhydratfärbung (PAS-Methode), Oligosaccharid-Profilierung, Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung oder isoelektrische Fokussierung.

20

25

Die Stabilität erfindungsgemäßer Formulierungen lässt sich beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, mithilfe von Stabilitätsprogrammen bestimmen, z.B. einer Lagerung bei 25°C und 60% relativer Luftfeuchte und bei 40°C und 70% relativer Luftfeuchte über einen längeren Zeitraum hinweg und Bestimmung der Stabilität oder

30 strukturellen Integrität des Proteins in regelmäßigen Intervallen beispielsweise durch obengenannte Nachweismethoden (SE-HPLC, FT-IR; SDS-PAGE (reduzierend oder nicht-reduzierend)) nachweisen.

30

Nachweismethoden zur biologischen Aktivität oder Wirksamkeit  
erfindungsgemäßer Antikörper in erfindungsgemäßen Formulierungen  
umfassen beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, ELISA,  
5 biologische Zellassays, FTIR oder CD.

Nachweismethoden verminderter Aggregationstendenz  
erfindungsgemäßer hochkonzentrierte Formulierungen umfassen  
beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, visuelle Kontrolle, Sub-  
10 visible particles Analyse, Nephelometrie oder Turbidimetrie, Dynamic  
Light Scattering Characterization.

**Beispiel 1: Herstellung einer hochkonzentrierten flüssigen anti-EGFR-  
Antikörperformulierung durch Tangentialflussfiltration (TFF)**

15 380 ml Protein (17 mg/ml in 10 mM Phosphat + 145 mM NaCl, pH 7.2)  
werden mittels einer Labscale-TFF-Analge (Millipore) mit eingebauter  
Polyethersulfon-Ultrafiltrationsmembran mit einem Cutoff von 30 kDa für  
22 6min bei einem Eingangsdruck von 20 psi und einem Ausgangsdruck  
20 von 10 psi aufkonzentriert. Das erhaltene Retentat weist eine  
Proteinkonzentration von ca. 132 mg/ml auf. Die Ausbeute beträgt 85%.

oder

25 470 ml Protein (1 7mg/ml in 10mM Citrat) werden mittels einer Labscale-  
TFF-Analge (Millipore) mit eingebauter Polyethersulfon-  
Ultrafiltrationsmembran mit einem Cutoff von 30 kDa für 226 min bei  
einem Eingangsdruck von 20 psi und einem Ausgangsdruck von 10 psi  
aufkonzentriert. Das erhaltene Retentat weist eine Proteinkonzentration  
30 von ca. 123mg/ml auf. Die Ausbeute beträgt 95%.



**Beispiel 2: Herstellung einer hochkonzentrierten flüssigen Formulierung von anti-EGFR-Antikörpern durch gerührte Ultrafiltration**

5        25 ml Protein (10 mg/ml in 10 mM Phosphat + 145 mM NaCl, pH 7.2)  
werden mittels einer Amicon-Rührzelle mit eingebauter Polyethersulfon-  
Ultrafiltrationsmembran mit einem Cutoff von 30 kDa für 144 min bei  
einem Stickstoff-Gasdruck von 4 bar aufkonzentriert. Das erhaltene  
Retentat weist eine Proteinkonzentration von ca. 92 mg/ml auf. Die  
10       Ausbeute beträgt 95%.

oder

15       25 ml Protein (10 mg/ml in 10 mM Citrat, pH 5,5) werden mittels einer  
Amicon-Rührzelle mit eingebauter Polyethersulfon-Ultrafiltrationsmembran  
mit einem Cutoff von 30 kDa für 168min bei einem Stickstoff-Gasdruck von  
4bar aufkonzentriert. Das erhaltene Retentat weist eine  
Proteinkonzentration von ca. 82 mg/ml auf. Die Ausbeute beträgt 95%.

20       **Beispiel 3: Herstellung einer hochkonzentrierten flüssigen Formulierung von anti-EGFR-Antikörpern durch Ultrafiltration unter Einwirkung von Zentrifugalkräften**

25       15 ml Protein (2 mg/ml in 10 mM Phosphat + 145 mM NaCl, pH 7.2)  
werden in einem Ultrafree-Zentrifugenröhrchen (Millipore) mit einer  
Polyethersulfon-Ultrafiltrationsmembran mit einem Cutoff von 30 kDa bei:  
2000\*g für 90 min zentrifugiert. Das erhaltene Retentat weist eine  
Proteinkonzentration von ca. 116mg/ml auf. Die Ausbeute beträgt 95%.

30       **Beispiel 4: Untersuchung auf lösliche Aggregate der hochkonzentrierten flüssigen Formulierung von anti-EGFR-Antikörpern**

Die in den Beispielen 1 bis 3 erhaltenen Retentate wurden mittels SE-HPLC auf den Gehalt an löslichen Aggregaten untersucht. Dabei war der Anteil an Monomer nach Aufkonzentrierung >99%.

5

**Beispiel 5: Untersuchung auf Nativität der hochkonzentrierten flüssigen Formulierung von anti-EGFR-Antikörpern**

Die im Beispiel 1 erhaltenen Retentate wurden FT-IR-spektrometrisch untersucht. Dabei waren die Amid I-2. Ableitung-Spektren des Ausgangsmaterials vor Aufkonzentrierung mittels Tangentialflussfiltration und des erhaltenen Retentats kongruent.

10

15

20

25

30

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung einer hochkonzentrierten, flüssigen Formulierung enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente durch Ultrafiltration.  
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 10 – 250 mg/ml aufweist.  
10
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 50 – 180 mg/ml aufweist.  
15
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 100 – 150 mg/ml aufweist.
- 20 5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper monoklonal ist und muriner oder humaner Herkunft ist.
- 25 6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper muriner Herkunft ist und chimär oder humanisiert ist.
- 30 7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000) ist.

8. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente.
- 5 9. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 10 – 250 mg/ml aufweist.
- 10 10. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 50 – 180 mg/ml aufweist.
- 15 11. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 100 – 150 mg/ml aufweist.
- 20 12. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper monoklonal ist und muriner oder humaner Herkunft ist.
- 25 13. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper muriner Herkunft ist und chimär oder humanisiert ist.
- 30 14. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-

EGFR-Antikörper Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000) ist.

- 5           15. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente erhältlich durch ein Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7.
- 10           16. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 15 als lagerstabiles Arzneimittel.
- 15           17. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 16, dadurch gekennzeichnet dass sie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthält.
- 20           18. Verwendung einer hochkonzentrierten, flüssigen Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 17 zur Herstellung eines Medikaments.
- 25           19. Verwendung einer hochkonzentrierten, flüssigen Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 17 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumoren und/oder Tumormetastasen.
- 30           20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei der Tumor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Gehirntumor, Tumor des Urogenitaltrakts, Tumor des lymphatischen Systems, Magentumor, Kehlkopftumor, Monozytenleukämie, Lungenadenokarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Glioblastom und Brustkarzinom.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000797

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/395 A61K9/08 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/007988 A (MERCK PATENT GMBH; MAHLER, HANNS-CHRISTIAN; MUELLER, ROBERT; MARTINI-M) 30 January 2003 (2003-01-30) page 4	8, 9, 12-20
X	WO 03/053465 A (MERCK PATENT GMBH; MAHLER, HANNS-CHRISTIAN; ZOBEL, HANS-PETER; MUELLER) 3 July 2003 (2003-07-03) page 4 pages 5-6 examples 3-5	8, 9, 12-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 2005

Date of mailing of the international search report

06/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Domingues, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000797

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/096457 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H; GENEN) 5 December 2002 (2002-12-05) page 4 pages 8,10,17 examples 2,7,8,10	1-20
Y	WO 2004/001007 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION; YANG, TZUNG-HORNG; BACICA, MICHAEL,) 31 December 2003 (2003-12-31) pages 2-3 pages 6,11 pages 14-16 pages 20-23	1-20
Y	US 6 252 055 B1 (RELTON JULIAN MARCUS) 26 June 2001 (2001-06-26) columns 2,5 examples 1,2	1-20
Y	CH 684 164 A5 (ROTKREUZSTIFTUNG ZENTRALLABORATORIUM BLUTSPENDEDIENST SRK) 29 July 1994 (1994-07-29) pages 4-5	1-20
Y,P	HARRIS REED J ET AL: "Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies" DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 61, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 137-154, XP002324970 ISSN: 0272-4391 pages 145-147	1-20
Y,P	WO 2004/085474 A (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED; TARNOWSKI, JOSEPH; VELEZ, DANIEL; GOLDST) 7 October 2004 (2004-10-07) page 23	1-20
T	VAN REIS, ZYDNEY: "In Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation" 1999, WILEY & SONS, XP009046105 page 2197 - page 2214	1-20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP2005/000797

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03007988	A	30-01-2003	DE 10133394 A1	30-01-2003
			BR 0211060 A	20-07-2004
			CA 2453342 A1	30-01-2003
			CN 1527724 A	08-09-2004
			CZ 20040189 A3	12-05-2004
			WO 03007988 A1	30-01-2003
			EP 1406658 A1	14-04-2004
			JP 2004536129 T	02-12-2004
			MX PA04000340 A	04-05-2004
			SK 862004 A3	07-07-2004
			US 2004170632 A1	02-09-2004
WO 03053465	A	03-07-2003	DE 10163459 A1	03-07-2003
			AU 2002358533 A1	09-07-2003
			BR 0215266 A	07-12-2004
			CA 2470316 A1	03-07-2003
			WO 03053465 A2	03-07-2003
			EP 1455824 A2	15-09-2004
			HU 0402192 A2	28-01-2005
WO 02096457	A	05-12-2002	BR 0209777 A	01-06-2004
			CA 2448345 A1	05-12-2002
			CN 1537015 A	13-10-2004
			WO 02096457 A2	05-12-2002
			EP 1397159 A2	17-03-2004
			JP 2004532262 T	21-10-2004
			US 2004170623 A1	02-09-2004
WO 2004001007	A	31-12-2003	AU 2003251592 A1	06-01-2004
			WO 2004001007 A2	31-12-2003
US 6252055	B1	26-06-2001	AU 731950 B2	05-04-2001
			AU 2958997 A	05-01-1998
			BR 9709267 A	10-08-1999
			CA 2254983 A1	04-12-1997
			EA 1860 B1	22-10-2001
			EP 0907378 A1	14-04-1999
			JP 3338060 B2	28-10-2002
			JP 11512753 T	02-11-1999
			NO 985464 A	18-01-1999
			NZ 332625 A	28-04-2000
			PL 330111 A1	26-04-1999
			CN 1219882 A	16-06-1999
			CZ 9803824 A3	12-05-1999
			WO 9745140 A1	04-12-1997
			ID 16966 A	27-11-1997
			KR 2000015935 A	15-03-2000
			TR 9802423 T2	22-02-1999
			ZA 9704486 A	23-11-1998
CH 684164	A5	29-07-1994	NONE	
WO 2004085474	A	07-10-2004	WO 2004085474 A2	07-10-2004



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/000797

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 A61K39/395 A61K9/08 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/007988 A (MERCK PATENT GMBH; MAHLER, HANNS-CHRISTIAN; MUELLER, ROBERT; MARTINI-M) 30. Januar 2003 (2003-01-30) Seite 4	8,9, 12-20
X	WO 03/053465 A (MERCK PATENT GMBH; MAHLER, HANNS-CHRISTIAN; ZOBEL, HANS-PETER; MUELLER) 3. Juli 2003 (2003-07-03) Seite 4 Seiten 5-6 Beispiele 3-5	8,9, 12-20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. April 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/05/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Domingues, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 02/096457 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H; GENEN) 5. Dezember 2002 (2002-12-05) Seite 4 Seiten 8,10,17 Beispiele 2,7,8,10	1-20
Y	WO 2004/001007 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION; YANG, TZUNG-HORNG; BACICA, MICHAEL,) 31. Dezember 2003 (2003-12-31) Seiten 2-3 Seiten 6,11 Seiten 14-16 Seiten 20-23	1-20
Y	US 6 252 055 B1 (RELTON JULIAN MARCUS) 26. Juni 2001 (2001-06-26) Spalten 2,5 Beispiele 1,2	1-20
Y	CH 684 164 A5 (ROTKREUZSTIFTUNG ZENTRALLABORATORIUM BLUTSPENDEDIENST SRK) 29. Juli 1994 (1994-07-29) Seiten 4-5	1-20
Y,P	HARRIS REED J ET AL: "Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies" DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, Bd. 61, Nr. 3, März 2004 (2004-03), Seiten 137-154, XP002324970 ISSN: 0272-4391 Seiten 145-147	1-20
Y,P	WO 2004/085474 A (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED; TARNOWSKI, JOSEPH; VELEZ, DANIEL; GOLDST) 7. Oktober 2004 (2004-10-07) Seite 23	1-20
T	VAN REIS, ZYDNEY: "In Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation" 1999, WILEY & SONS, XP009046105 Seite 2197 - Seite 2214	1-20

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/000797

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 03007988	A	30-01-2003	DE	10133394 A1	30-01-2003
			BR	0211060 A	20-07-2004
			CA	2453342 A1	30-01-2003
			CN	1527724 A	08-09-2004
			CZ	20040189 A3	12-05-2004
			WO	03007988 A1	30-01-2003
			EP	1406658 A1	14-04-2004
			JP	2004536129 T	02-12-2004
			MX	PA04000340 A	04-05-2004
			SK	862004 A3	07-07-2004
			US	2004170632 A1	02-09-2004
WO 03053465	A	03-07-2003	DE	10163459 A1	03-07-2003
			AU	2002358533 A1	09-07-2003
			BR	0215266 A	07-12-2004
			CA	2470316 A1	03-07-2003
			WO	03053465 A2	03-07-2003
			EP	1455824 A2	15-09-2004
			HU	0402192 A2	28-01-2005
WO 02096457	A	05-12-2002	BR	0209777 A	01-06-2004
			CA	2448345 A1	05-12-2002
			CN	1537015 A	13-10-2004
			WO	02096457 A2	05-12-2002
			EP	1397159 A2	17-03-2004
			JP	2004532262 T	21-10-2004
			US	2004170623 A1	02-09-2004
WO 2004001007	A	31-12-2003	AU	2003251592 A1	06-01-2004
			WO	2004001007 A2	31-12-2003
US 6252055	B1	26-06-2001	AU	731950 B2	05-04-2001
			AU	2958997 A	05-01-1998
			BR	9709267 A	10-08-1999
			CA	2254983 A1	04-12-1997
			EA	1860 B1	22-10-2001
			EP	0907378 A1	14-04-1999
			JP	3338060 B2	28-10-2002
			JP	11512753 T	02-11-1999
			NO	985464 A	18-01-1999
			NZ	332625 A	28-04-2000
			PL	330111 A1	26-04-1999
			CN	1219882 A	16-06-1999
			CZ	9803824 A3	12-05-1999
			WO	9745140 A1	04-12-1997
			ID	16966 A	27-11-1997
			KR	2000015935 A	15-03-2000
			TR	9802423 T2	22-02-1999
			ZA	9704486 A	23-11-1998
CH 684164	A5	29-07-1994	KEINE		
WO 2004085474	A	07-10-2004	WO	2004085474 A2	07-10-2004